Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. med. K. Botzenhart
Abteilung: Medizinische Virologie und Epidemiologie
der Viruskrankheiten
Abteilungsleiter: Prof. Dr. med. H.-J. Gerth

VERMEHRUNG VON HUMANEN INFLUENZA-A-VIREN IN MENSCHLICHEN FIBROBLASTEN

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Theoretische Medizin)
der Eberhard - Karls - Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
DIPL. BIOL. MICHAEL KEUSER
aus Boppard

1984

LIBRARY
LONDON
USE

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. med. K. Botzenhart
Abteilung: Medizinische Virologie und Epidemiologie
der Viruskrankheiten
Abteilungsleiter: Prof. Dr. med. H.-J. Gerth

VERMEHRUNG VON HUMANEN INFLUENZA-A-VIREN IN MENSCHLICHEN FIBROBLASTEN

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Theoretische Medizin)
der Eberhard - Karls - Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
DIPL. BIOL. MICHAEL KEUSER
aus Boppard

1984

Dekan: Prof. Dr. med. G. Fichtner
1.Berichterstatter: Prof. Dr. med. H.-J. Gerth
2.Berichterstatter: Prof. Dr. med. vet. J. Schmitt

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung für Medi=
zinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten
(Direktor: Prof.Dr.H.-J.Gerth) am Hygiene-Institut in
Tübingen durchgeführt.

Herrn Prof.Dr.H.-J.Gerth danke ich für die Überlassung
des Themas und die gute Betreuung.

Weiterhin möchte ich besonders für die wertvolle Betreu=
ung, die vielen Anregungen und Diskussionen Frau Dr. Angelika
Vallbracht danken.

Die gute, kollegiale Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft
aller meiner Mitarbeiter möchte ich nicht unerwähnt
lassen.

Frau Dr.H.Willers danke ich für die Überlassung der
Influenza-A-Isolate.

Seite		
3	A.	Einleitung
9	B.	Material und Methoden
9	B.I.	Virusstämme
10	B.II.	Zellen
11	B.III.	Materialien
14	B.IV.	Methoden zur Virusvermehrung
14	B.IV.1.	Methoden zur Virusvermehrung im Brutei
14	B.IV.1.a.	Beimpfen der Allantoishöhle
14	B.IV.1.b.	Gewinnung der Allantoisflüssigkeit
15	B.IV.2.	Vermehrung in Zellkulturen
16	B.V.	Methoden zur Zellzüchtung
16	B.V.1.	Herstellung von Hühnerfibroblastenkulturen
17	B.V.2.	Züchtung von primären Affennierenzellen
17	B.V.3.	Züchtung von humanen WISH-Zellen
17	B.V.4.	Züchtung von FRhK-4-Zellen
17	B.V.5.	Züchtung von menschlichen Fibroblasten
18	B.VI.	Methoden zur quantitativen Bestimmung von infektiösen Influenza-A-Viren
18	B.VI.1.	Plaque-Titration
19	B.VI.2.	Endverdünnung im Brutei
19	B.VI.2.a.	Titration im Brutei
19	B.VI.2.b.	Hämagglutinationsreaktion zur Bestimmung des HA-Gehalts
20	B.VII.	Trypsinbehandlung menschlicher Fibroblastenkulturen

Seite		
21	C.	Versuche und Ergebnisse
21	C.I.	Quantitativer Nachweis der Produktion von infektiösen Influenza-A-Viren menschlicher Herkunft
21	C.I.1	Plaque-Bildung in Hühnerfibroblasten
22	C.I.2.	Plaque-Bildung in FRhK-4-Zellen
22	C.I.3.	Plaque-Bildung in WISH-Zellen
22	C.I.4.	Plaque-Bildung in primären Affennierenzellen
23	C.II.	Trypsinbehandlung von menschlichen Fibroblasten
25	C.III.	Wachstum von Influenza-A-England 1/61 in Hühnerfibroblasten mit und ohne Trypsin
29	C.IV.	Vermehrung menschlicher Influenza-A-Stämme auf menschlichen Fibroblasten
29	C.IV.1.	Vermehrung in menschlichen Fibroblasten ohne Trypsin
32	C.IV.2.	Virusvermehrung in menschlichen Fibroblasten bei Zugabe von Trypsin
39	D.	Diskussion
46		Zusammenfassung
48		Literaturverzeichnis

A. Einleitung

Influenza ist eine akute Erkrankung des Respirationstraktes, die epidemisch und in größeren Zeitabständen auch pandemisch auftreten kann. Die Grippe ist bis heute eine der wenigen großen Infektionskrankheiten geblieben, die noch nicht unter Kontrolle gebracht werden konnte. Der Erreger der Grippe, die Influenza-Viren, wird immunologisch in 3 Typen A,B und C unterteilt, wobei dem Typ A wegen seiner hohen Variabilität der Antigenstruktur eine besondere Rolle zukommt. Die Influenza-Viren bestehen aus einem Nukleokapsid mit dem RNA-Genom und dem Matrix-Protein mit der Virushülle. Auf der Virushülle befinden sich wie Spikes die Oberflächenantigene Hämagglutinin und Neuramidase.
Die komplexe Epidemiologie der Influenza beruht auf der Antigenshift und Antigendrift der Influenza-A-Viren. Als Antigendrift wird eine allmähliche Änderung der immunogenen Antigene der Viruspopulation bezeichnet. Die Hämagglutininuntereinheiten besitzen 2 verschiedene antigene Genotypen, die im Verlauf einer Antigendrift unabhängig voneinander variieren. Eine dieser Hämagglutinin-Genotypen ändert ihre antigenen Eigenschaften schnell, wobei die andere relativ konstant bleibt (Laver et al. 1974).
Diese Änderung im Hämagglutinin oder in der Neuramidase der Influenza-A-Viren beruhen wahrscheinlich auf Punktmutationen der entsprechenden Gene (Francis et al. 1965)
Diese Antigendrift trägt zum Auftreten der sogenannten interpandemischen Welle bei, deren Schwere vom immunologischen Status der Bevölkerung und von der Virulenz der jeweiligen Stämme abhängig ist (Fox et al. 1973).

Im Gegensatz dazu bedeutet die Antigenshift eine tiefgreifende, plötzlich auftretende Änderung des antigenen Aufbaus eines oder beider Oberflächenantigene, des Hämagglutinins oder der Neuramidase. Diese Antigenshift ist eine Voraussetzung für das Auftreten einer Pandemie.
Eine ursprünglich von Mulder und Masurel (1958) vertretene Hypothese nimmt an, daß Influenza-A-Virus-Reservoire im Tierreich durch genetische Interaktionen zwischen existierenden Humaninfluenza-Stämmen und Stämmen aus Mammalia und Vögeln für das Auftreten neuer Subtypen eine entscheidende Rolle spielen.
Die auffallend hohe Rekombinationsrate von Influenza-A-Viren (Burnet et al. 1954, Simpson et al. 1964, Sugiura et al. 1966, Simpson et al. 1969) wird heute dadurch erklärt, daß das Genom der Influenza-A-Viren in 8 Segmenten vorliegt (Hirst et al. 1962, Pons et al. 1968, 1975), die bei Doppelinfektion einer Zelle in toto ausgetauscht werden können.
Es gibt nicht ausschließlich humanpathogene Influenza-A-Viren, sondern auch artspezifische Stämme, zum Beispiel bei Pferden, Schweinen und verschiedenen Vögeln. Die verschiedenen artspezifischen Influenza-A-Stämme können unterschiedliche antigene Eigenschaften in ihren Oberflächenantigenen, Hämagglutinin und Neuramidase, haben. Aber nicht nur im Wirtsspektrum unterscheiden sich verschiedene Influenza-A-Stämme, sondern auch im Ausmaß der Infektion und im Befall bestimmter Organe. So verursachen humane Influenza-A-Viren akute entzündlich-katarrhalische Erkrankungen des oberen Respirationstraktes, indem sie die Epithelzellen der Luftwege infizieren. Es gibt jedoch auch Influenza-A-Viren, welche in den für sie spezifischen Wirtsorganismen zu ausgedehnten Infektionen führen. Zum Beispiel verursacht das Virus der Klassischen Geflügelpest bei seinem natürlichen Wirt eine generalisierte, fatale Infektion mit Beteiligung des zentralen Nervensystems.

Kürzlich wurde auch bei Säugern ein neurovirulenter Stamm isoliert (Webster et al. 1981, Lang et al. 1981): Während eines großen Seehundsterbens in New England im Winter 1979/80 konnten Influenza-A-Viren aus Lunge und Gehirn von Seehunden, welche an akuter hämorrhagischer Pneumonie starben, isoliert werden.
Was ist nun die Ursache der Wirts- und Zellspezifität von Influenza-A-Viren? Mit Sicherheit ist die unterschiedliche Pathogenität verschiedener Influenza-Stämme die Folge einer unterschiedlichen Empfänglichkeit bestimmter Zellen eines Wirts (Rott et al. 1979, Bosch et al. 1979, Scholtisseck et al. 1978), und die Möglichkeit dieser Zellen, infektiöses Virus zu produzieren, ist sowohl wirts- als auch virusabhängig.
Es stellte sich nun die Frage, welche molekularen Mechanismen für die Infektiosität von Influenza-A-Viren verantwortlich sind. Einmal muß das Virus die Fähigkeit besitzen in die Wirtszellen eindringen zu können, zum anderen müssen seine genetischen Informationen in der Wirtszelle realisiert werden.
Klenk et al. (1975) konnte zeigen, daß eine Voraussetzung für die Infektiosität die Spaltung des Oberflächenantigens Hämagglutinin ist. Trypsinbehandlung von Viren ist eine in vitro-Methode, das Hämagglutinin der Viren zu spalten. Tritt durch Trypsinbehandlung von Viren eine signifikante Steigerung der Infektiosität der in bestimmten Zellen produzierten Viren ein, so muß die Ursache in der Spaltung von Hämagglutinin liegen. Umgekehrt können in vivo nur solche Zellen infektiöse Partikel produzieren, welche zelleigene Enzyme besitzen, die Hämagglutinin spalten können.
Das Hämagglutinin von Influenza-A-Viren besteht aus einem 75000 - 80000 Dalton Glycoprotein, welches entweder als eine Einzelpeptidkette (HA), oder als ein durch Disulfidbrücken verbundener Komplex aus 2 Polypeptidketten mit einem Molekulargewicht von ca. 50000 (HA_1) und 30000 (HA_2) besteht (Lazarowitz et al. 1971, Laver et al. 1971, Stanley et al. 1973).

Diese Polypeptidketten sind derart gefaltet, daß eine bestimmte Spaltungsregion proteolytischen Enzymen zugänglich ist (Klenk 1974). HA_1 und HA_2 entstehen durch enzymatische Spaltung aus HA (Lazarowitz et al. 1971, Skehel 1972). Die proteolytische Spaltung wurde durch die Beobachtung festgestellt, daß Inkubation in vitro mit Trypsin zu einer Konversion von HA zu HA_1 und HA_2 führte (Lazarowitz et al. 1973), und daß die Spaltung von HA durch Proteaseinhibitoren geblockt werden kann (Klenk and Rott 1973). Dies weist darauf hin, daß die Spaltungsenzyme wirtsspezifische Proteasen sind, und daß nur solche Zellen, die diese Enzyme besitzen, infektiöse Influenza-A-Partikel produzieren können. Die Spaltung von Hämagglutinin ist zwar notwendig für die Infektiosität von Influenza-A-Viren, sie ist aber weder Vorbedingung für Viruszusammenbau - oder freisetzung, noch für Hämagglutination und Adsorbtion.
Da die HA-Spaltung eine Voraussetzung der Infektiosität für die Influenza-A-Viren darstellt, kann eine Ursache der unterschiedlichen Pathogenitätsspektren von Influenza-A in der unterschiedlichen Fähigkeit verschiedener Zellarten liegen, Viren mit gespaltenem HA, also infektiöse Partikel, zu produzieren. Eine weitere Ursache der unterschiedlichen Pathogenitätsspektren könnte in der Existenz verschiedener HA-Typen liegen, welche von bestimmten Zellarten gespalten werden können, von anderen nicht. Ein alleiniger Austausch von einem HA-Typ schwerer Spaltbarkeit durch einen, welcher leicht zu spalten ist, könnte dann zu einer veränderten Pathogenität führen.

In kürzlich veröffentlichten Arbeiten (Vallbracht et al. 1979, 1980) über Rekombinationsexperimente mit FPV/Rostock (Hav1N1), dem Erreger der Klassischen Geflügelpest, welcher eine generalisierte Infektion mit Beteiligung des Zentralnervensystems in Hühnern produziert und Mäuselungen adaptierten menschlichen Stämmen England 1/61 (H2N2) oder

PR/8/34 (H1N1) wurden Rekombinanten isoliert, welche eine generalisierte Infektion mit Beteiligung des Zentralnervensystems in Mäusen hervorriefen.
Die genetische Information von Influenza-A-Viren liegt auf 8 getrennten RNA-Segmenten vor. Die Segmente 4 und 6 codieren für die beiden Oberflächenantigene Hämagglutinin und Neuramidase, während die Stücke 1-3 die genetische Information für RNA-Polymerasestrukturen darstellen, welche für die Replikation des Virus von Bedeutung sind.
Eine Kombination von Hämagglutinin Hav1 und dem M-Protein von FPV-Rostock mit bestimmten Polymeraseproteinen von an Mäuselungen adaptierten Stämmen produzierte neue Virusstämme, welche zu generalisierten Infektionen in Mäusen führten. Infektiöse Viren konnten in Lunge, Gehirn und Blut von Mäusen nachgewiesen werden. Durch Austausch von HA wurde also die isolierte Lungenvirulenz für die Maus erweitert und ein Virus mit hoher Neurovirulenz für dieses Säugetier erhalten. Weiterhin wurde eine Korrelation zwischen dieser generalisierten Infektion in Mäusen in vivo und der Fähigkeit der Rekombinanten zur Vermehrung in Mäuseembryofibroblasten in vitro gefunden, einer Fähigkeit, welche die Elternstämme dieses Rekombinationssystems nicht besitzen. Aus dem Maussystem läßt sich ableiten:
Auf die Lunge begrenzte Virulenz der pneumovirulenten Stämme von Influenza-A ist durch fehlende Spaltbarkeit dieser HA-Typen in bestimmten Zellen, wie z.B. Fibroblasten zu erklären.
Von dieser Hypothese ausgehend läßt sich die zentrale Fragestellung wie folgt formulieren:
Kann man diese Hypothese in einem System mit humanen Influenza-A-Stämmen und humanen Fibroblasten in vitro bestätigen?
Das heißt: 1. Gibt es humane Influenza-A-Isolate, die einen produktiven Replikationszyklus in menschlichen Fibroblasten durchmachen? Gibt es eine Korrelation zur Virulenz dieser Stämme in vitro?

2. Falls Punkt 1 nicht zutrifft, liegt die Ursache einer abortiven Infektion, das heißt einer Infektion ohne Produktion infektöser Partikel, auch in der fehlenden Spaltbarkeit der HA-Typen in diesen Zellen?

Zur Durchführung der Arbeit wurden menschliche Influenza-A-Isolate der letzten 10 Jahre, und zwar die beiden epidemiologisch wichtigen Serotypen H3N2 und ab 1977 H1N1, verwendet. Es wurden auch Isolate von Todesfällen untersucht.
Es wurde den Fragen nachgegangen, ob eine Vermehrung in menschlichen Fibroblasten stattfindet, in wieweit die Virusnachkommenschaft infektionstüchtig ist und ob die Zugabe von Trypsin in vitro zu einer produktiven Infektion führt. Das heißt, falls sich humane Influenza-A-Viren nicht in menschlichen Fibroblasten vermehren können, liegt ein früher Block der Vermehrung in der Wirtszelle vor, oder liegt die Ursache erst in der mangelnden Spaltbarkeit von HA durch die Zellen?

B. Material und Methoden

I. Virusstämme

Die humanen Influenza-A-Stämme wurden uns freundlicher Weise von Dr. H.Willers, staatliches Medizinaluntersuchungsamt Hannover - Virologische Abteilung - zur Verfügung gestellt.

Stamm Nr.	Stammbezeichnung	entspricht	Variante	isoliert
1	A/Hannover/42/71	A/H K /68	H3N2	R.A.
2	" /45/71	"	"	S.M.
3	" /7 /72	"	"	R.A.
4	" /9 /72	"	"	"
5	" /73/75	A/Pt Ch /1/73	"	"
6	" /95/75	"	"	"
7	" /96/75	"	"	S.M.
8	" /10/76	A/Vict /3/75	"	R.A.
9	" /33/76	"	"	"
10	" /35/76	"	"	"
11	" /79/76	"	"	S.M.
12	" /80/76	"	"	R.A.
13	" /1 /77	"	"	"
14	" /60/77	"	"	"
15	" /3 /78	A/USSR/90/77	H1N1	"
16	" /4 /78	A/Texas/1/77	H3N2	"
17	" /46/78	"	"	"
18	" /47/78	A/USSR/90/77	H1N1	"
19	" /121/78	A/Texas/1/77	H3N2	"
20	" /123/78	A/Ussr/90/77	H1N1	"
21	" /1 /79	"	"	"
22	" /5 /79	"	"	"
23	" /9 /80	A/Bangkok/1/79	H3N2	"
24	" /24/80	Intermediär A/Texas/1/77 u. A/Bangkok/1/79	"	"

Tabelle I: Die in der Arbeit verwendeten Influenza-A-Stämme

Kontroll-Influenza-A-Stämme:

A/England 1/61 (H2N2)

A/V1/Tübingen/73 (Hav1N1)
Rekombinante zwischen England 1/61 (H2N2) FPV/Rostock (Hav1N1)

Herkunft: Abteilung Medizinische Virologie und Epidemiologie, Hygiene-Institut, Tübingen

II. Zellen

Wish human (CCl 25)	: Menschliche Amnionzellinie ca. 180. Passage Herkunft: American Type Culture Collection
FRhK-4	: Zellinie von Rhesusaffennierenzellen, ca. 50. Passage Herkunft: American Type Culture Collection
Affennierenzellen	: 2. Passage von Cercopithecus aethiops-Zellen Herkunft: Firma Flow
Menschliche Fibroblasten	: Zellstamm menschlicher Embryolungenfibroblasten, Anzucht im Hygieneinstitut-Virologie-Tübingen, ca. 30. Passage
Primäre Hühnerfibroblasten	: Kulturen wurden aus Embryonen von 8-10 Tage lang gebrüteten Hühnereiern hergestellt.

III. Materialien

Wenn nicht weiter angegeben, handelt es sich bei den verwendeten Chemikalien um analysenreine Substanzen der Firma Merk, Darmstadt. Alle verwendeten Medien waren Trockenmedien der Firma Serva, Heidelberg.

Hanks' Salzlösung:

Stammlösung A

160 g NaCl
8 g KCl
4 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

---

in 800 ml Aqua bidest.
2,8 g $CaCl_2$ in 200 ml Aqua bidest.
2 ml Chloroform

Stammlösung B

3,04 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$
1,20 g KH_2PO_4
20,00 g $C_6H_{12}O_6$

---

in 800 ml Aqua bidest.
100 ml 0,4%-ige Phenolrotlösung
auf 1000 ml auffüllen
2 ml Chloroform

---

50 ml Stammlösung A+50 ml Stammlsg. B
900 ml Aqua bidest.
100 IE/ml Penicillin G
100 µg/ml Streptomycin

PBS (Kochsalz-Phosphatpuffer) pH 7,2 ohne Ca und Mg

8,0g NaCl
0,2g KCl
2,89 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$
o,2g KH_2PO_4
100 IE/ml Penicillin G
100 µg/ml Streptomycin

---

in 1000 ml Aqua bidest.

Trypsin:	2·kristallisiert (Serva)
PBS-Trypsin:	2,5g Trypsin in 1000 ml PBS Filtration mit Membranfilter 100 IE/ml Penicillin-G 100 µg/ml Streptomycin
Citrat-Dextrose-Lsg.:	1,26g Na-Citrat $2H_2O$ 4,00g Zitronensäure 11,00g Dextrose --- in 500 ml Aqua bidest.
Agar, Noble:	Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA
CMC (Carboxymethylcellulose):	Serva, Heidelberg
Overlay Medium:	9,37g TC 199_E (Serva, Heidelberg) 2,00g $NaHCO_3$ 0,30g L-Glutamin 1,00g Serum Albumin (Behring Werke Ag., Marburg)
Kälberserum:	Flow Laboratories, Bonn
Fetales Kälberserum:	Flow Laboratories, Bonn
Overlay-Medium:	MEM_E doppelt (Serva, Heidelberg) 0,5% Lactalbumin
Microtiterplatten: (V-förmig)	Greiner, Nürtingen
Multi-Well-Plates: (24 Loch)	Falcon, Oxnard, USA
Membranfilter	Sartorius, Göttingen

In der Arbeit verwendet Abkürzungen:

R.A.	Rachenabstrich
S.M.	Sektionsmaterial
HK	Hongkong
Pt Ch	Port Chalmers
Vict	Victoria
HA	Hämagglutination
CMC	Carboxymethylcellulose
EID	Eiinfektiöse-Dosis
OA	Oberflächenantigen

Methoden zur Virusvermehrung

1. Methoden der Virusvermehrung im Brutei

Die Vermehrung der verwendeten Influenza-A-Stämme erfolgte in der Allantoishöhle von 10-11 Tage bei 37°C bebrüteten embryonierten Hühnereiern.

a) Beimpfen der Allantoishöhle

Die bebrüteten Eier wurden durchleuchtet um zu prüfen, ob die Embryonen lebten. Der Luftsackrand wurde an der Seite markiert, auf der das Auge des Embryos zu erkennen war. 1-2 cm über dieser Markierung wurde nach der Desinfektion mit einer Jodlösug mit einer Dentalnadel ein Loch in die Eischale gebohrt und anschließend wieder desinfiziert. Durch dieses Loch wurde mit einer Kanüle die Allantoishöhle mit 0,2 ml Virussuspension beimpft. Um eine bakterielle Infektion weitgehend zu vermeiden, wurden die entsprechenden Virusverdünnungen mit Hanks' - Salzlösung + 50IE Penicillin und 50 γ Streptomycin pro ml durchgeführt. Nach der Beimpfung wurde das Injektionsloch mit UHU-Kleber verschlossen. Die Eier wurden bei 33°C bebrütet, und nach 24 Stunden wurde eine Traumakontrolle durchgeführt. Die Eier mit abgestorbenen Embryonen wurden verworfen.

b) Gewinnung der Allantoisflüssigkeit

Nach ca. 30 stündiger Inkubationszeit wurden die Embryonen durch Abkühlung auf 4° C (18 Stunden) abgetötet. Vor Eröffnung der Kalkschale im Bereich des Luftsacks wurde dieser Bereich mit Jodlösung und Alkohol desinfiziert. Die innere Schalenhaut, die Chorioallantois- und die Amnionmembran

wurden mit einem sterilen Pinzettenpapier aufgerissen und die Allantoisflüssigkeit mit einer Pipette abgesaugt.
In der Regel betrug die Ausbeute ca. 10-12 ml Allantoisflüssigkeit pro Brutei.
Die Allantoisflüssigkeit jedes Eies wurde einzeln in der Hämagglutinationsreaktion auf ihren Virusgehalt getestet, die virushaltigen Flüssigkeiten zusammengegeben und bei 3000 U/min (etwa 21 60g) in der Kühlzentrifuge (Stock, Marburg) 30 Min zentrifugiert. Der Überstand wurde in Ampullen abgefüllt und bei -80°C eingefroren.

2. Die Vermehrung in Zellkulturen

Die zu einem dichten Zellrasen ausgewachsenen Kulturen wurden zweimal in Hank's - Salzlösung gewaschen, um Serumsreste zu entfernen. Die Inkubation erfolgte mit 0,1 ml Virussuspension pro Loch der Multi-Well-Plates. Die Adsorptionszeit betrug eine Stunde bei Zimmertemperatur. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Hanks' - Salzlösung gewaschen, um nicht adsorbiertes Virus im Überstand zu entfernen.
Als Erhaltungsdosis wurden jeweils 0,5 ml MEM/Earles bei den menschlichen Fibroblasten, bzw. TC 199/Earles bei den Hühnerfibroblasten auf die Zellkultur gegeben.
Nach 5 Minuten Inkubationszeit bei Zimmertemperatur wurden 0,1 ml je Loch der Multi-Well-Plates als Nullwert entnommen, gepoolt und bei -80°C tiefgefroren. 0,1 ml der entsprechenden Medien wurden dann nachgefüllt und die Kulturen in einem Luft-CO_2 Gemisch (95:5) bei 34°C inkubiert.

V. Methoden zur Zellzüchtung

In der vorliegenden Arbeit wurden primäre Zellkulturen von Hühnerfibroblasten und Affennieren verwendet. Weiterhin wurde mit den Zellinien von humanen WISH-Zellen (ca. 180. Passage) und FRhK4-Zellen (50. Passage) und einem Zellstamm von menschlichen Fibroblasten (30.-40.Passage) gearbeitet.

1. Herstellung von Hühnerfibroblastenkulturen.

8-9 Tage lang bebrütete Embryonen dienten zur Herstellung von Hühnerembryoblastenkulturen. Die Eier wurden durchleuchtet und der Luftsack angezeichnet. Die Chorioallontois- und Amnionmembran wurde nach Desinfektion und Entfernung der Kalkschale aufgerissen, und der Embryo wurde steril entnommen. Der Kopf und die Eingeweide des Embryos wurden entfernt, die restlichen Teile zweimal mit Hanks'-Salzlösung gewaschen und in einer sterilen Petrischale kleingeschnitten. Die zerkleinerten Teile wurden in einem Erlenmeyerkolben 20 Minuten mit einem Magnetrührer bei 37°C gerührt. Pro Embryo wurden 6 ml Trypsin (0,25%-ige Lösung in PBS 100 IE Penicillin und 100 µg Streptomycin pro ml) zugegeben. Nach der angegebenen Zeit wurde die Suspension durch eine Gaze gegeben, und die trypsinierten Zellen wurden 5 Minuten in der Kühlzentrifuge bei 2500 U/min sedimentiert. Das Trypsin wurde dekantiert und das Sediment 0,3%-ig in TC 199 Hanks' mit 10% Kälberserum aufgenommen und ausgesät. Die Kulturen wurden bei 37°C inkubiert und waren nach 48 Stunden zu einem dichten Zellrasen ausgewachsen.

2. Züchtung von Affennierenzellen

Die Anzüchtung erfolgte in TC 199 Hanks' + 7% fötales Kälberserum, und die Zellen wurden in der zweiten Passage übernommen. Nach Trypsinieren und anschließendem Abzentrifugieren wurden sie wieder in TC 199 Hanks' + 7% fötales Kälberserum aufgenommen und in Multi Well-Plates (0,5 ml pro Loch) überpipettiert. Die Inkubation der Kulturen erfolgte bei 37° C in einem Luft/CO_2 Gemisch (95/5) für 3-4 Tage.

3. Züchtung von humanen WISH-Zellen

Die Anzüchtung erfolgte in MEM/Earles mit 7% fötales Kälberserum und die Zellen wurden als ca. 180. Passage übernommen. Die Züchtung in Multi-Well Plates in MEM/Earles + 7% fötales Kälberserum erfolgte wie unter V.2. beschrieben.

4. Züchtung von FRhK-4-Zellen

Die Züchtung erfolgte in MEM/Earles + 0,5% Lactalbumin + 7% fötales Kälberserum, und die Zellen wurden in der 50. Passage übernommen. Die Züchtung in Multi-Well-Plates in MEM/Earles + 0,5% Lactalbumin + 7% fötales Kälberserum erfolgte wie unter V.2. beschrieben.

5. Züchtung von menschlichen Fibroblasten

Die menschlichen Fibroblasten wurden in der 30. Passage übernommen. Die Anzüchtung in Multi-Well-Plates in MEM/Earles mit 7% fötales Kälberserum erfolgte wie unter V.2. beschrieben.

VI. Methoden zur quantitativen Bestimmung von infektiösen Influenza-A-Viren

1. Plaque-Titration

Nach zweimaligem Waschen mit kalter Hanks'-Salzlösung wurden o,1 ml der verschiedenen Virusverdünnungen auf den Zellrasen gegeben. Die Adsorptionszeit betrug eine Stunde bei Zimmertemperatur.
Auf eine Multi-Well-Plate wurde das Overlay der entsprechenden Nährmedien zu gleichen Teilen mit 1,4%-igem Agar vermischt und mit einer Temperatur von 40° C auf den Zellrasen aufgebracht (0,5 ml pro Loch). Nach Erkalten des Agars wurden die Schalen im Inkubator in einem Luft/CO_2 Gemisch (95/5) 2-3 Tage bei 34° C inkubiert. Zum besseren Sichtbarmachen der Plaques wurden die lebenden Zellen im Dunkeln 6 Stunden mit 0,1 ml einer 0,01%-igen Neutralrotlösung angefärbt.
Parallel wurde auf eine zweite Multi-Well-Plate derselben Zellkultur das Overlay mit den entsprechenden Nährmedien zu gleichen Teilen mit CMC (2%-ig) vermischt, auf den Zellrasen gebracht und 2-3 Tage in einem Luft/CO_2 Gemisch (95/5) bei 34° C inkubiert. Nach der Entfernung des Overlays wurden zur besseren Sichtbarmachung der Plaques die Zellen mit je 200 µl 4%-iger Formalinlösung fixiert, nach 15 Minuten zweimal mit Aqua bidest gewaschen und dann mit 0,4%-igem Kristallviolett angefärbt.

2. Endverdünnung im Brutei

a) Titration im Brutei

10-11 Tage bebrütete Hühnereier wurden mit 0,2 ml verschiedener Virusverdünnungen inokuliert (2 Bruteier pro Virusverdünnung) und 24 Stunden bei 33° C inkubiert. Anschließend wurden die Embryonen durch Abkühlen auf 4° C getötet. Die Allantoisflüssigkeit wurde wie unter IV. 1. beschrieben geerntet und mit der Hämagglutinationsreaktion auf ihren HA-Gehalt getestet.

b) Hämagglutinationsreaktion zur Bestimmung des HA-Gehalts

Erythrozyten: Die Hühnererythrozyten wurden aus der Flügelvene weißer Leghorn-Hybridhühner unter Zusatz 15% Citrat-Dextrose-Lösung entnommen. Die Weiterverarbeitung erfolgte nach der von Clarke und Casals (Clarke and Casals 1965) angegebenen Methode. Die Hühnererythrozyten wurden bis zu einer Woche nach Entnahme verwendet. In der Regel wurde eine 0,5%-ige Suspension kurz vor der Verwendung hergestellt.
Technik der Hämagglutination: In Microtiterplatten (V-förmig) wurden Verdünnungsreihen der Virussuspensionen in PBS hergestellt. Die Methode entsprach im Wesentlichen der des Comittee on Standard Serological Procedures in Influenza Studies (1950) empfohlenen.
Nach 45 Minuten Sedimentationszeit wurde die Agglutination abgelesen.
Die höchste Verdünnung, die noch bei den Bruteiern zu einer HA-Produktion führte entspricht der EID. Interpolationen wurden nicht vorgenommen, da die Methode nur grobe Schätzwerte angeben kann.

VII. Trypsinbehandlung menschlicher Fibroblastenkulturen

Nachdem die Zellkulturen zu einem dichten Zellrasen angewachsen waren, wurde das Nährmedium abpipettiert und durch MEM/Earles mit verschiedenen Trypsinkonzentrationen (0,5 ml pro Loch der Multi-Well-Plates) ersetzt. Die Platten wurden dann bei 34° C in einem Luft/CO_2 Gemisch (95/5) inkubiert.

C. Versuche und Ergebnisse

I. Quantitativer Nachweis der Produktion von infektiösen Influenza-A-Viren menschlicher Herkunft

Am Beginn der Arbeit stand die Aufgabe, eine quantitativ genaue Methode zu finden, welche die Infektiosität von Influenza-A-Stämmen humaner Herkunft bestimmt.
Die Plaque-Tritation zur Bestimmung von infektiösen Einheiten wäre eine solche Nachweismethode. Deshalb wurden verschiedene Zellkulturen getestet, inwieweit die verwendeten humanen Influenza-A-Viren auf ihnen Plaques bilden können.
Bei diesen Versuchen beschränkten wir uns auf die Austestung jeweils eines Stammes der beiden Serotypen H1N1 und H3N2 der menschlichen Influenza-A-Isolate.

1. Plaque-Bildung in Hühnerfibroblasten

Getestet wurden die Stämme 15 (H1N1) und 16 (H3N2). Als Kontrollstamm diente Influenza-A/V1 (Hav1N1), da Hav1N1 sehr gut in vielen Zellkulturen gespalten wird und daher Plaque-Bildung nachzuweisen ist. (Bosch et al. 1979)
Ausgewertet werden konnten nur Platten, welche mit Agar beschichtet waren und anschließend mit Neutralrotlösung angefärbt wurden. Mit CMC als Overlay war keine charakteristische Plaque-Bildung festzustellen.
Ergebnis: Bei Influenza-A/V1 waren Plaques bis zu einer Verdünnung von 10^{-4} festzustellen, während bei den Stämmen 15 und 16 keine Plaques, auch keine cytopathischen Effekte in den hohen Konzentrationen zu erkennen waren.

2. Plaque-Bildung in FRhK-4-Zellen

Getestet wurden die Stämme 2 (H3N2) und 18 (H1N1). Als Kontrollstamm diente wiederum der Stamm Influenza A/V1. Wie bei dem vorhergehenden Versuch konnten nur die Platten, welche mit Agar beschichtet waren und anschließend mit Neutralrotlösung angefärbt wurden ausgewertet werden, da mit CMN als Overlay keine charakteristische Plaque-Bildung festzustellen war.
Ergebnis: Bei Influenza A/V1 waren Plaques in den FRhK-4 Zellen bis zu einer Verdünnung von 10^{-6} zu erkennen. Die Stämme 2 und 18 zeigten keine Plaques. Die konzentrierten Proben zeigten jeweils totale cytopathische Effekte.

3. Plaque-Bildung in WISH-Zellen

Getestet wurden die Stämme 2 (H3N2) und 18 (H1N1). Als Kontrollstamm diente Influenza A/V1.
Ergebnis: In den WISH-Zellen konnte weder bei Influenza-A/V1 noch bei den Stämmen 2 (H3N2) und 18 (H1N1) Veränderungen in den verschiedenen Konzentrationen festgestellt werden.

4. Plaque-Bildung in primären Affennierenzellen

Getestet wurden die Stämme 12 (H3N2) und 22 (H1N1). Als Kontrollstamm diente wiederum Influenza A/V1.
Ergebnis: Auch in primären Affennierenzellen konnte weder bei Influenza A/V1 noch bei den Stämmen 12 (H3N2) und 22(H1N1) Veränderungen in den verschiedenen Verdünnungen festgestellt werden.

Da bei den oben getesteten Zellkulturen keine Plaque-Bildung durch die verschiedene Serotypen (H1N1, H3N2) der humanen Influenza-A-Stämme nachgewiesen werden konnte, wurde in den folgenden Versuchen auf die Endverdünnung im Brutei zur Bestimmung der infektiösen Einheiten zurückgegangen.

II. Trypsinbehandlung von menschlichen Fibroblasten

Wie schon erwähnt haben Influenza-A-Viren mit ungespaltenem Hämagglutinin eine geringe Infektiosität, welche durch Trypsinbehandlung sehr stark erhöht werden kann, indem dieses Enzym das Oberflächenantigen HA in seine Untereinheiten HA_1 und HA_2 spaltet. Der aktivierenden Wirkung auf Influenza-A-Viren ist die schädigende Wirkung von Trypsin auf die Zellkulturen gegenüberzustellen. Sinn dieses Versuches war es nun diese schädigende Wirkung auf humane Fibroblasten in Abhängigkeit von verschiedenen Trypsinkonzentrationen zu untersuchen, um herauszufinden, mit welchen Trypsinkonzentrationen man noch menschliche Fibroblasten inkubieren kann, sodaß der schädigende Effekt dieses Enzyms erst dann zum Tragen kommt, nachdem die Aktivierung von Influenza-A-Viren und das Maximum ihrer Vermehrung in humanen Fibroblasten erreicht wurde.
Es wurden hierbei Trypsinverdünnungen von 5 µg/ml — 0,01 µg/ml verwendet und die Zellen nach 4 Stunden, 18 Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden unter dem Durchsichtmikroskop auf schädigende Wirkung untersucht.
Tabelle 1 zeigt, daß Konzentrationen von 5 µg/ml, wie bei Klenk et al. (1975) für Hühnerembryofibroblasten beschrieben, aber auch Konzentrationen von 2,5 µg/ml schon in den ersten Stunden der Inkubation einen starken schädigenden Effekt auf die Kulturen von menschlichen Fibroblasten hatten, während die schädigende Wirkung der Konzentrationen 1,25 µg/ml — 0,5 µg/ml erst nach 18 Stunden beziehungsweise 24 Stunden zum Tragen kam. Bei den Konzentrationen von 0,25 µg/ml und weniger konnten keine Veränderungen unter dem Durchsichtmikroskop im Vergleich zu den Kontrollen ohne Trypsin festgestellt werden.

Trypsinkonzentration (µg/ml)	Zustand des Monolayers nach 4 Std	18 Std.	24 Std.	48 Std.
5	totale Auflösung	——	——	——
2,5	beginnende Auflösung	totale Auflösung	——	——
1,25	"	starke Auflösung	totale Auflösung	——
1	keine Veränderung	beginnende Auflösung	totale Auflösung	——
0,5	"	Zellen nicht ganz dicht	"	——
0,25	"	keine Veränderung	keine Veränderung	keine Veränderung
0,1	"	"	"	"
0,05	"	"	"	"
0,025	"	"	"	"
0,01	"	"	"	"

Tabelle 1 : Wirkung verschiedener Trypsinkonzentrationen auf humane Fibroblasten in Abhängigkeit von der Zeit

III. Wachstum von Influenza A/England 1/61 in Hühnerfibroblasten mit und ohne Trypsin

Wie der vorherige Versuch zeigt, hat Trypsin eine schädigende Wirkung auf humane Fibroblastenkulturen. Diesem schädigenden Effekt auf Fibroblasten steht die aktivierende Wirkung dieses Enzyms auf Influenza-A-Viren gegenüber.
In einem System, in welchem die Trypsinaktivierung von Influenza-A-Viren in menschlichen Fibroblastenkulturen untersucht werden soll, muß berücksichtigt werden, daß durch die Beeinträchtigung der Zellen durch Trypsin die Aktivierung der Influenza-A-Viren durch dieses Enzym nicht voll zum Ausdruck kommen könnte, da die Zellen so stark zerstört werden, daß die Viren sich in ihnen nicht mehr vermehren können.
Sinn des folgenden Versuches ist eine Trypsinkonzentration zu finden, welche die Zellkulturen nicht so stark schädigt, daß die Aktivierung und Vermehrung der Viren im Vordergrund steht. Dazu wurde untersucht, ob mit den Trypsinkonzentrationen, die in Versuch II nach 18 Stunden Inkubation auf humane Fibroblasten einen schädigenden Effekt erkennen ließen eine Aktivierung und Vermehrung von Influenza-A-Viren erreicht werden könnte.
Hierfür wurde das Wachstum von dem Stamm Influenza A/England /1/61 in Hühnerfibroblasten mit und ohne Trypsin untersucht.
Influenza A/England /1/61 kann, falls die Viruspartikel gespaltenes Hämagglutinin besitzen, Hühnerfibroblasten infizieren. Da die Hühnerfibroblasten selbst jedoch nicht die Fähigkeit besitzen, das HA von Engl. /1/61 in HA_1 und HA_2 zu spalten, sind die in diesen Zellkulturen produzierten Engl. /1/61-Viruspartikel nicht infektiös, weil die HA-Spaltung Voraussetzung für die Infektiosität ist (Klenk et al. 1975).

Durch Zugabe von verschiedenen Trypsinkonzentrationen zu mit Influenza A/England 1/61 infizierten Hühnerfibroblasten sollte nun untersucht werden, inwieweit auch mit niedrigen Trypsinkonzentrationen eine Steigerung der Infektiosität erreicht werden kann.
Dazu wurden dicht gewachsene Hühnerfibroblasten mit 10^4 infektiöse Einheiten von Influenza A/England 1/61 inokuliert. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt und neues Medium ohne Trypsin bzw. mit Trypsinkonzentrationen von 5 µg/ml — 0,5 µg/ml aufgegeben. Nach 48 Stunden wurde das Medium entnommen. Die Endverdünnung im Brutei mit anschließender Hämagglutinationsreaktion wurde als Nachweis der Virusvermehrung durchgeführt.

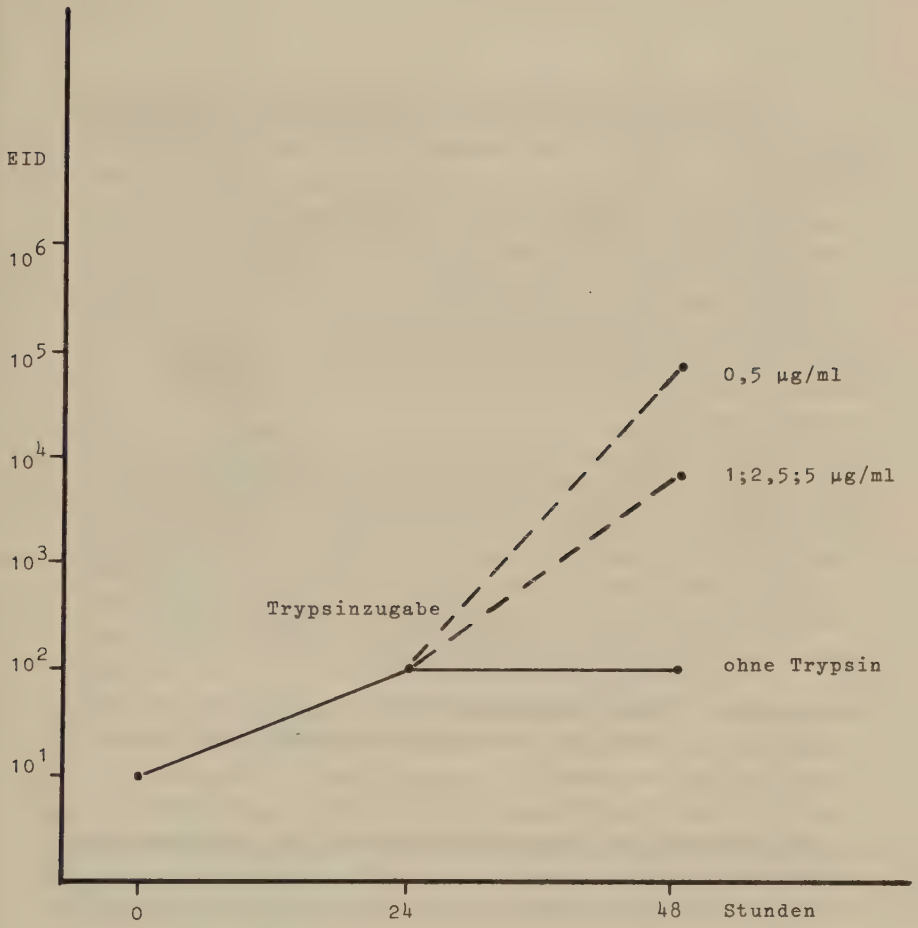

Abbildung 1 : Wachstum von England/1/61 in Hühnerfibroblasten ohne Trypsin und in verschiedenen Trypsinkonzentrationen
Inokulationsdosis : 10^4 EID

Abbildung 1 zeigt, daß im Vergleich zu den Proben ohne Trypsin eine signifikante Steigerung der Infektiosität von Influenza A/England 1/61 aus Hühnerfibroblasten durch Inkubation mit verschiedenen Trypsinkonzentrationen zu erreichen ist. Wie aus Abbildung 1 weiterhin zu entnehmen ist, war die beste Aktivierung mit der niedrigsten Trypsinkonzentration zu sehen, obwohl nach 24 Stunden bei den Hühnerfibroblasten mit Trypsin im Gegensatz zu denen ohne Trypsin eine deutliche Auflösung des Zellrasens zu beobachten war.
Die Tatsache, daß auch eine verhältnismäßig geringe Menge infektiöser Viren in diesen Zellkulturen ohne Trypsin gebildet werden, stimmt mit der Beobachtung von Klenk überein, daß in Systemen, in welchen überwiegend inaktive Viren gebildet werden auch immer eine geringe Menge infektiöser Viruspartikel gebildet wird; wahrscheinlich durch eine unspezifische HA-Spaltung.

Aufgrund des Ergebnisses dieses Versuches erschien es sinnvoll, bei der folgenden Untersuchung zum Wachstum der humanen Influenza-A-Stämme in menschlichen Fibroblasten mit niedrigen Trypsinkonzentrationen von 1 µg/ml bzw. 0,5 µg/ml zu arbeiten, die eine starke Erhöhung der Infektiosität durch Spaltung des HA von England 1/61 auf Hühnerfibroblasten bewirkten.
Obwohl Klenk in seinen Aktivierungsversuchen durch Trypsin mit höheren Konzentrationen (5 µg/ml) gearbeitet hatte, wählten wir niedrigere Konzentrationen, um die schädliche Wirkung des Trypsins auf menschliche Fibroblasten zu reduzieren.

IV. Vermehrung menschlicher Influenza-A-Stämme auf menschlichen Fibroblasten

In diesem Versuch wurde der Frage nachgegangen, ob es humane Influenza-A-Isolate gibt, welche einen produktiven Replikationszyklus in menschlichen Fibroblasten durchmachen können, beziehungsweise, falls dies nicht zutrifft, ob die Ursache einer abortiven Infektion in einer fehlenden Spaltbarkeit der HA-Typen in diesen Fibroblasten liegt.
Die uns freundlicherweise von Fr. Dr. Willers zur Verfügung gestellten Influenza-A-Stämme humaner Herkunft wurden zunächst im Brutei vermehrt, um einen konstanten Ausgangspool für die nachfolgenden Untersuchungen zur Verfügung zu haben.
Drei der in Tabelle I aufgeführten Stämme (Nr. 5,6,7) konnten nicht mehr angezüchtet werden.
Die vor den folgenden Versuchsreihen durchgeführten Bestimmungen der infektiösen Einheiten in den Ausgangspools erfolgte durch Endverdünnung im Brutei.

1. Vermehrung in menschlichen Fibroblasten ohne Trypsin

Für den Wachstumsversuch wurden menschliche Fibroblastenkulturen mit 10^4 infektiösen Einheiten pro Loch der Multi-Well-Plates inokuliert. In jedem dieser Löcher befanden sich ca. 1×10^5 Zellen. Wie im Methodenteil beschrieben, wurde nach der Adsorbtionszeit und Zugabe von Erhaltungsmedium der Nullwert entnommen und nach 24 Stunden Inkubation das Medium gewechselt. Nach 48 Stunden wurde das Medium geerntet. Alle Proben wurden sofort bei -80°C eingefroren und gemeinsam austitriert.

Stamm Nr.	OA	Vermehrung in menschl. Fibroblasten (EID) 0-Wert	24h	48h
2	H3N2	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
1o	"	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
11	"	10^1	10^1	10^1

Tabelle 3: Vermehrung menschlicher Influenza-A-Isolate aus Todesfällen. Inokulationsdosis; 10^4 EID

Stamm Nr.	OA	Vermehrung in menschl. Fibroblasten (EID) 0-Wert	24h	48h
3	H3N2	$< 10^1$	$< 1o^1$	$< 10^1$
4	"	$< 10^1$	$< 1o^1$	$< 1o^1$
8	"	$1o^1$	$1o^2$	$1o^2$
12	"	$< 1o^1$	$1o^2$	$1o^2$
13	"	$< 1o^1$	$< 1o^1$	$1o^1$
14	"	$< 1o^1$	$< 1o^1$	$< 1o^1$
16	"	$< 1o^1$	$< 1o^1$	$1o^2$
17	"	$1o^1$	$1o^1$	$< 1o^1$
19	"	$< 1o^1$	$< 1o^1$	$< 1o^1$
15	H1N1	$< 1o^1$	$< 1o^1$	$1o^1$
18	"	$< 1o^1$	$1o^2$	$1o^2$
20	"	$< 1o^1$	$< 1o^1$	$< 1o^1$
21	"	$< 1o^1$	$1o^2$	$1o^1$
22	"	$1o^1$	$< 1o^1$	$1o^1$

Tabelle 4 : Vermehrung menschlicher Influenza-A-Isolate von ambulant behandelten Patienten.
Inokulationsdosis: 10^4 EID

Stamm Nr.	OA	Vermehrung in menschl. Fibroblasten (EID)		
		0-Wert	24h	48h
1	H3N2	10^1	10^1	10^1
9	"	10^1	10^2	10^2
23	"	10^2	10^1	10^2
24	"	10^1	10^1	10^1

Tabelle 5 : Vermehrung menschlicher Influenza-A-Isolate von stationär behandelten Patienten. Inokulationsdosis: 10^4 EID

Es wurden 21 Isolate auf Produktion infektiöser Partikel in menschlichen Fibroblasten-Monolayers getestet. Bei 10 dieser 21 Influenza-A-Isolate konnten weder nach 24 Stunden noch nach 48 Stunden infektiöses Virus festgestellt werden. Bei 11 Stämmen konnte nur geringe Infektiosität festgestellt werden. Die höchste gemessene Infektiosität betrug bei dem 48-Stunden-Wert 10^2 EID.

Weder die Gruppe der humanen Influenza-A-Isolate von stationär behandelten Patienten noch diejenige von ambulant behandelten Patienten zeigten eine verstärkte Produktion von infektiösem Virus entsprechend der Inokulationsdosis. Im Vergleich zu den Isolaten aus Rachenabstrichen zeigten diejenigen von Todesfällen keine Unterschiede im Wachstum in humanen Fibroblasten. Damit scheinen die Todesfälle nicht in einer Beziehung zu einer veränderten Virulenz dieser Influenza-A-Isolate im Sinne einer leichteren Spaltbarkeit von HA und der damit verbundenen Möglichkeit einer generalisierten Infektion zu stehen.

2. Virusvermehrung in menschlichen Fibroblasten bei Zugabe von Trypsin

Da, wie die vorausgegangenen Untersuchungen zeigten, nur sehr wenige infektiöse Partikel nach Inokulation menschlicher Fibroblasten von diesen Zellen produziert werden, untersuchten wir die Wirkung von Trypsin auf die Produktion infektiöser Viren in diesen Zellen.
Wir verwendeten ein Behandlungsschema, welches sich in früheren Untersuchungen (Vallbracht, persönliche Mitteilung) als günstig erwiesen hatte.
Die Zellen wurden mit 10^4 EID inokuliert und 24 Stunden ohne Trypsin bei 34°C inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgte die Zugabe von Trypsin in Konzentration von 1 µg/ml beziehungsweise 0,5 µg/ml. Die Kontrollen verblieben ohne Trypsin.
Bei allen Stämmen konnte eine Steigerung der Infektiosität durch Aktivierung mit Trypsin beobachtet werden. Das Ausmaß der Aktivierung schwankte zwischen dem Hundert- und Hunderttausendfachen, verglichen mit den entsprechenden Werten der EID bei 48 - Stunden - Proben ohne Trypsin (Tabellen 3,4 und 5).
Ein signifikanter Unterschied in der Vermehrung in menschlichen Fibroblasten und in ihrer Aktivierbarkeit durch Trypsin zwischen den Stämmen mit dem Hämagglutinin H3 und H1 konnte nicht beobachtet werden. (Tabellen 6,7).

Stamm Nr.	Vermehrung in humanen Fibro (EID) nach 48h	
	ohne Trypsin	1µg/ml Trypsin
1	$<10^1$	10^2
2	$<10^1$	10^3
3	$<10^1$	10^2
4	$<10^1$	10^2
8	10^2	10^4
9	10^2	10^4
10	$<10^1$	10^4
11	10^1	$\geq 10^5$
12	10^2	10^4
13	10^1	$\geq 10^6$
14	$<10^1$	10^4
16	10^2	10^5
17	$<10^1$	$\geq 10^5$
19	10^1	10^3
23	10^2	10^5
24	$<10^1$	10^5

Tabelle 6: Vermehrung menschlicher Influenza-A-Isolate mit OA H3N2 Inokulationsdosis 10^4 EID

Stamm Nr.	Vermehrung in human. Fibro. (EID) nach 48h	
	ohne Trypsin	1µg/ml Trypsin
15	10^2	$\geq 10^5$
18	10^2	10^5
20	$<10^1$	10^2
21	10^1	10^4
22	10^1	10^3

Tabelle 7: Vermehrung menschlicher Influenza-A-Isolate mit OA H1N1. Inokulationsdosis 10^4 EID

Stamm Nr.	OA	Vermehrung in human. Fibro. (EID, 48h) 0,5µg/ml	1µg/ml
1	H3N3	10^1	10^2
2	"	10^2	10^3
4	"	10^1	10^2
3	"	10^2	10^2
8	"	10^2	10^4
9	"	10^4	10^4
16	"	10^5	10^5
17	"	10^3	10^5
18	H1N1	10^3	10^5
21	"	10^2	10^4

Tabelle 8: Vermehrung menschlicher Influenza-A-Isolate in verschiedenen Trypsinkonzentrationen. Inokulationsdosis: 10^4 EID

Wie Tabelle 8 zeigt, wurde in 7 der 10 Versuche bei Trypsinkonzentrationen von 0,5 µg/ml eine geringere EID gefunden als bei 1 µg/ml, sodaß es uns nicht sinnvoll erschien die Trypsinkonzentration noch weiter zu reduzieren.

Die absoluten Zahlen der Aktivierungsraten durch Trypsin bei den verschiedenen Stämmen zeigen natürlich eine große Schwankungsbreite in diesen biologischen Systemen, aus denen ohne weitere eingehende Untersuchungen kein Schluß gezogen werden kann.

Die Abbildungen 2-4 zeigen noch einmal zusammenfassend den Verlauf der Virusvermehrung in menschlichen Fibroblasten verschiedener Influenza-A-Isolate menschlicher Herkunft ohne und in Gegenwart von Trypsin.

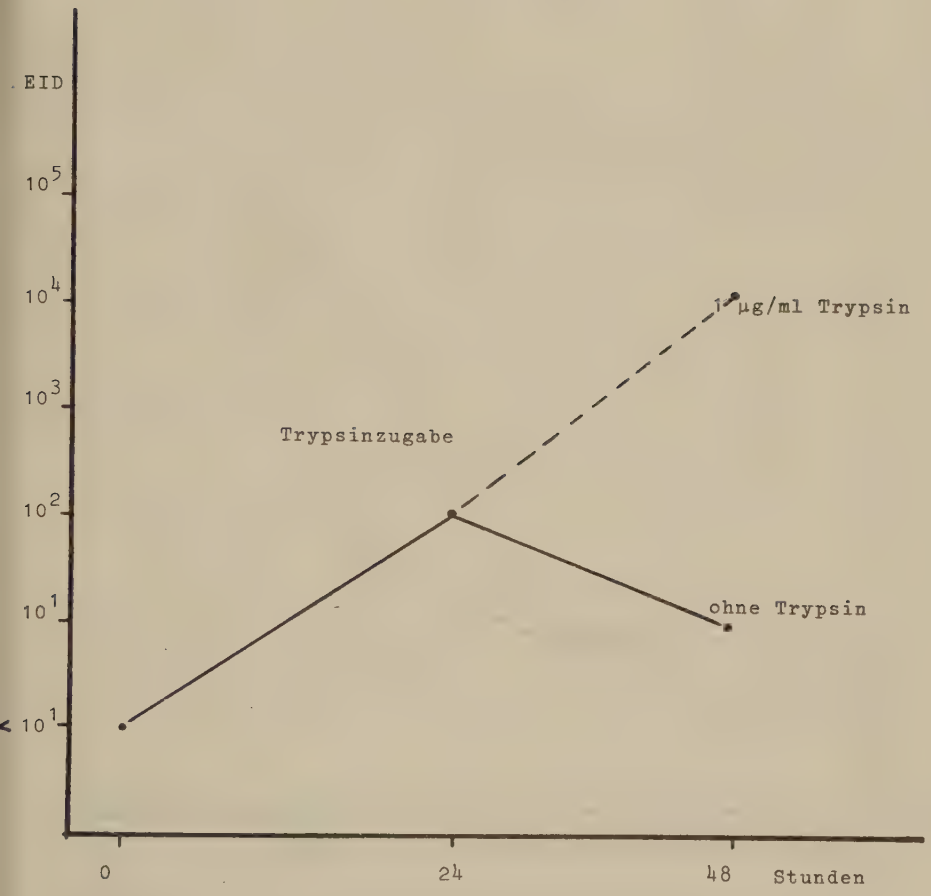

Abbildung 2 : Vermehrung von Influenza-A-Isolat Nr. 21 (H1N1) in menschlichen Fibroblasten
Inokulationsdosis: 10^4 EID

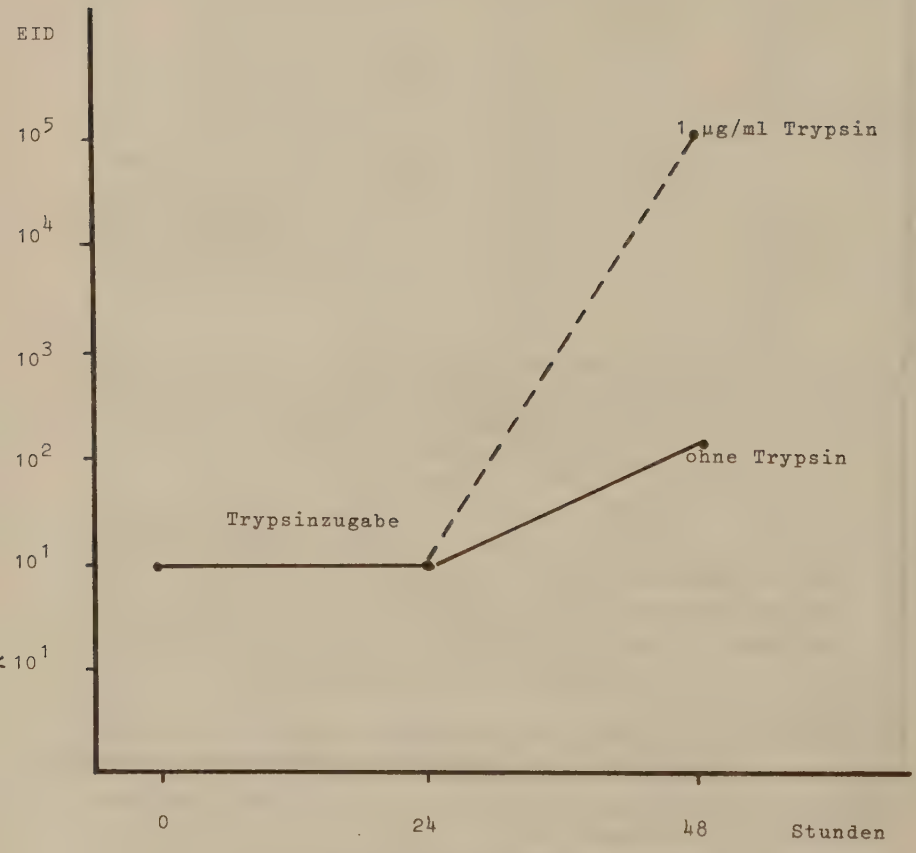

Abbildung 3 : Vermehrung von Influenza-A-Isolat Nr. 16 (H3N2) in menschlichen Fibroblasten
Inokulationsdosis: 10^4 EID

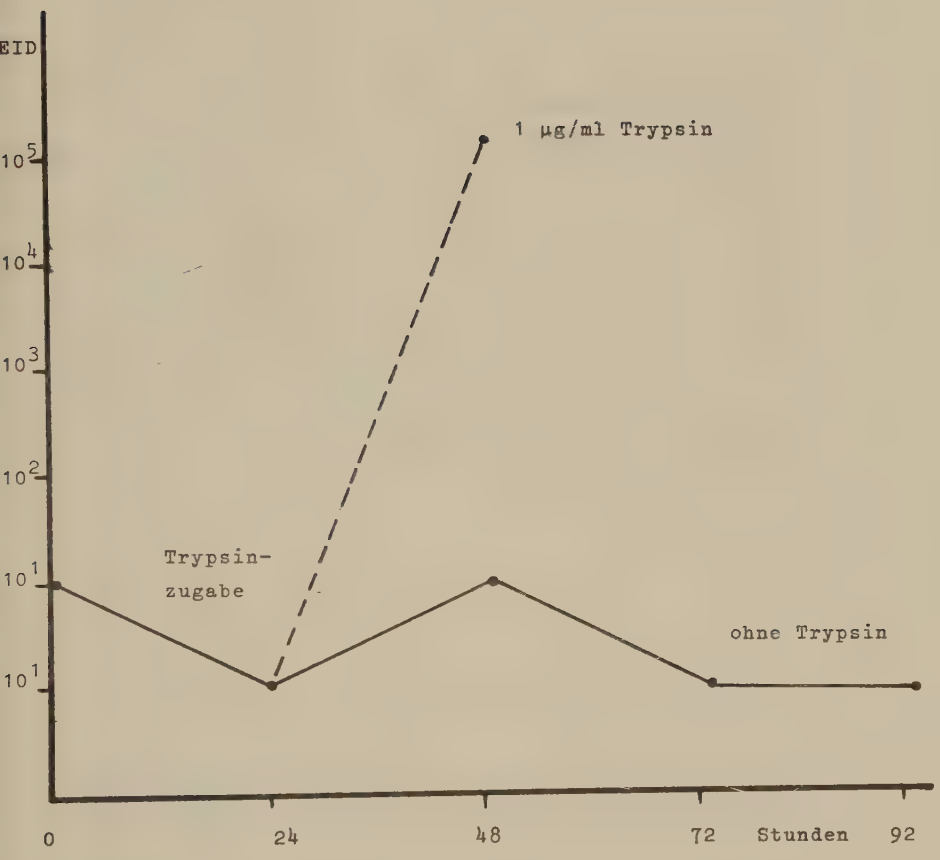

Abbildung 4 : Vermehrung von Influenza-A-Isolat. Nr. 23 (H3N2) in menschlichen Fibroblasten
Inokulationsdosis: 10^4 EID

Wie die Kurven zeigen ist zwar ohne Trypsin teilweise auch eine geringe Menge an infektiösen Partikeln nachzuweisen (siehe Tabelle 3-5), die aber wieder abnimmt. Jedoch ist durch Trypsinbehandlung eine starke Erhöhung der Infektiosität zu beobachten. Wie Abbildung 4 weiterhin zeigt, ist auch nach 72 bzw. 96 Stunden in der Fraktion ohne Trypsin keine Virusvermehrung festzustellen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß in allen Fällen eine signifikante Aktivierung der Stämme in menschlichen Fibroblasten durch Trypsin erreicht werden konnte. Dies bedeutet, daß wahrscheinlich der Block in der Vermehrung menschlicher Influenza-A-Viren in menschlichen Fibroblasten nur in der fehlenden Spaltung des Hämagglutinin durch diese Zellen liegt.

D. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen der beim Menschen ausschließlich auf den oberen Respirationstrakt begrenzten Vermehrungsfähigkeit von Influenza-A und dem fehlenden Wachstum von Influenza-A-Viren humaner Herkunft auf menschlichen Fibroblasten besteht. Mit anderen Worten, es sollte gezeigt werden, ob sich die Hypothese halten läßt, daß eine auf die Lunge begrenzte Influenza-Infektion mit der Unfähigkeit menschlicher Fibroblasten, infektiöse Influenza-A-Viren humaner Herkunft zu produzieren, verbunden ist.

Dazu wurde untersucht, ob menschenpathogene Influenza-A-Viren in humanen Fibroblasten in Kulturen wachsen können, insbesondere, ob durch Trypsinbehandlung der Viren (d.h. HA-Spaltung) eine Steigerung der Infektiosität erreicht werden kann.
Kein oder nur sehr schwaches Wachstum mit und ohne Trypsin auf menschlichem Fibroblasten würde bedeuten, daß Influenza-A-Viren nicht imstande sind, ihre gesamten Virusproteine und Virus-RNA im Cytoplasma der Fibroblastenzelle zu synthetisieren. Hierfür könnte zum Beispiel ein Faktor notwendig sein, welcher in der Zelle nicht gebildet wird.
Kein oder nur schwaches Wachstum ohne Trypsin und Steigerung der Infektiosität durch Trypsinbehandlung der Viren würde bedeuten, daß zur Vermehrung von infektiösen Influenza-A-Partikeln in menschlichen Fibroblasten lediglich die Spaltung von Hämagglutinin notwendig ist, und daß die Fibroblastenzelle diese Fähigkeit nicht besitzt.

Zu Beginn der Arbeit galt es, eine Methode zu finden, mit Hilfe derer es möglich war, das Wachstum von Influenza-A-Viren in menschlichen Fibroblasten nachzuweisen. Die Plaque-Titration zur Bestimmung der infektiösen Einheiten wäre eine solche empfindliche Methode gewesen.

Hierzu wurden Plaque-Tests mit Influenza-A-Stämmen auf Hühnerembryofibroblasten, primären Affennierenzellen, FRhK-4-Zellen und menschlichen Wishzellen durchgeführt. Bei keiner dieser Kulturen konnte Plaque-Bildung durch die menschlichen Influenza-A-Stämme der Serotypen H3N2 und H1N1 gefunden werden. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde zur Titration der infektiösen Partikel auf die Endverdünnung im Brutei und der Bestimmung der EID zurückgegriffen.

Als nächstes stellte sich die Aufgabe, die Wirkung von Trypsin auf humane Fibroblastenkulturen zu untersuchen. Zwar wird die Zelle durch dieses Enzym nicht in dem Sinne verändert, daß sie nunmehr verstärkt infektiöses Virus bildet (Klenk et al. 1975), doch besitzt dieses Ferment eine stark schädigende Wirkung auf alle Körperzellen. Es galt nun eine Trypsinkonzentration zu finden, mit der einmal eine Aktivierung der Influenza-A-Viren menschlicher Herkunft erreicht werden konnte, deren schädigende Wirkung jedoch erst nach dem Wachstumsmaximum der Viren, welches ca. 12 Stunden nach Inkubationsbeginn erreicht ist, zum Ausdruck kommt. Hierzu wurden Fibroblastenzellmonolayer Trypsinkonzentrationen von 5 µg/ml - 0,01 µg/ml ausgesetzt, und der Effekt unter dem Durchsichtsmikroskop nach bestimmten Zeitabständen beobachtet.
Schon nach 4 Stunden waren stark schädigende Effekte bei Konzentrationen von 5 µg/ml und 2,5 µg/ml zu erkennen. Bei den Konzentrationen von 1 µg/ml und 0,5 µg/ml begann die Auflösung des Zellrasens nach 18 Stunden. Bei geringeren Konzentrationen konnte keine Veränderung festgestellt werden.

Des weiteren stellte sich die Frage, mit welchen Trypsinkonzentrationen eine Virusaktivierung, das heißt eine proteolytische Spaltung des HA erreicht werden konnte. Hierzu

wurde als Kontrolle das Wachstum von Influenza A/England 1/61 untersucht, von dem bekannt ist, daß er sich auf Hühnerembryofibroblastenzellkulturen nur in Anwesenheit von Trypsin vermehren kann. Es wurden Trypsinkonzentrationen von 5 µg/ml - 0,5 µg/ml verwendet. Diese Trypsinkonzentrationen lagen zwar unter denen, welche von Klenk et al. (1975) in ihren Versuchen verwendet wurden, doch wurde bei diesen Konzentrationen schon eine schädigende Wirkung auf die Zellen verzeichnet, die bei 1 µg/ml und 0,5 µg/ml erst nach 18 Stunden beobachtbar war, so daß eine Produktion von infektiösen Partikel in diesem Konzentrationsbereich vermutet werden konnte.
Wie der Versuch zeigt, konnte durch die Trypsinbehandlung von Influenza-A/England 1/61 eine starke Steigerung der Infektiosität der in Hühnerembryofibroblastenzellen produzierten Viren erreicht werden, die bei der Trypsinkonzentration von 0,5 µg/ml am stärksten war. Die Steigerung betrug das Tausendfache im Vergleich zu den Proben ohne Trypsin, in welchen ebenfalls geringe Produktion infektiöser Partikel registriert wurde. Dies steht mit den Befunden von Klenk et al. (1975) im Einklang, daß in einem System, in dem vorzugsweise nur inaktives Virus gebildet wird auch geringe Mengen von infektiösen Viren entstehen. Hierfür ist wahrscheinlich eine unspezifische Spaltung von Hämagglutinin verantwortlich.

Aufgrund dieses Versuches erschien es sinnvoll, die Aktivierungsversuche mit den humanen Influenza-A-Stämmen in menschlichen Fibroblasten mit Trypsinkonzentrationen von 1 µg/ml beziehungsweise 0,5 µg/ml durchzuführen, da einmal in diesem Konzentrationsbereich erst nach 18 Stunden Inkubation eine Auflösung des Zellrasens beobachtet wurde, zum anderen eine erhebliche Steigerung der Produktion infektiöser Partikel erreicht werden konnte.
In dieser Versuchsreihe konnte festgestellt werden, daß bei allen untersuchten Stämmen durch Trypsinbehandlung der Kulturen

eine Steigerung der Infektiosität im Überstand erreicht werden konnte. Das Ausmaß der Steigerung durch Trypsin betrug das Hundert- bis Hunderttausendfache der infektiösen Einheiten, verglichen mit den entsprechenden Werten der EID bei den 48-h-Proben ohne Trypsin.
Alle 21 Stämme zeigten Produktion von infektiösen Partikeln in Anwesenheit von Trypsin.
Bei 10 der 21 Stämme war weder bei dem 24h-Wert, noch bei dem 48h-Wert ohne Trypsinbehandlung infektiöses Virus nachzuweisen. Bei 11 Stämmen traten geringe Mengen infektiöser Partikel auf. Auch dies steht, wie der Versuch mit Influenza A/England 1/61, mit den Ergebnissen von Klenk et al. (1975) in Einklang, daß ohne Trypsinbehandlung auch geringe Mengen infektiöser Viren gebildet werden können.
Menschliche Fibroblasten, welche von humanen Influenza-A-Stämmen infiziert werden, sind nicht in der Lage, Viruspartikel mit gespaltenen HA, also infektiöse Partikel zu produzieren. Die Produktion geringer Mengen infektiöser Partikel ist wahrscheinlich auf eine unspezifische HA-Spaltung zurückzuführen. Jedoch muß hier auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß es sich hier um Mischpopulationen von Influenza-A-Stämmen handeln könnte. In diesem Zusammenhang wäre interessant zu untersuchen, ob durch Passagen von diesen Influenza-A-Stämmen in menschlichen Fibroblasten Viruspartikel mit spaltbaren HA selektierbar wären.
Wie in dem Versuch mit dem Influenza-A-Isolat 23 gezeigt wurde (Abb. 4), nimmt die geringe Menge infektiöser Viren, welche ohne Trypsinbehandlung produziert wurde, im Laufe von 2 Tagen wieder ab.

Es gab keine signifikanten Unterschiede in der Produktion infektiöser Partikel zwischen den Influenza-A-Stämmen der Serotypen H3N2 und H1N1.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zeigen, daß zur Produktion von infektiösen Influenza-A-Viren in menschlichen Fibroblasten die Anwesenheit von Trypsin Vorbedingung ist, daß also zunächst das Hämagglutinin in HA_1 und HA_2 gespalten werden muß.
Die Begrenzung der Influenza-A beim Menschen auf den oberen Respirationstrakt könnte darauf zurückzuführen sein, daß nur die Epithelzellen der oberen Luftwege in der Lage sind, Viren mit gespaltenem HA zu produzieren, so daß eine massive Produktion infektiöser Partikel, und damit Befall weiterer Zellen, nur im oberen Respirationstrakt möglich ist.

Im Vergleich zu den Isolaten aus den Rachenabstrichen zeigten diejenigen von Todesfällen keine Unterschiede im Wachstum in humanen Fibroblasten. Damit scheinen die Todesfälle nicht in einer Beziehung zu einer veränderten Virulenz dieser Influenza-A-Isolate im Sinne einer leichteren Spaltbarkeit von HA und der damit verbundenen Möglichkeiten einer generalisierten Infektion zu stehen.

Menschliche Fibroblasten sind also nicht fähig, das Hämagglutinin von humanen Influenza-A-Wildstämmen in seine Untereinheiten HA_1 und HA_2 zu spalten, weshalb in diesen Zellen keine infektiösen Partikel synthetisiert werden können. Erst die Spaltung von Hämagglutinin durch Trypsin ermöglicht den Viren eine Verstärkung der Infektiosität. Damit ist aber auch gezeigt, daß die HA-Spaltung die einzige Vorbedingung ist für die produktive Vermehrung in menschlichen Fibroblasten. Das heißt, daß Synthese von Virusproteinen und Virus-RNA, Zusammenbau der viralen Bestandteile und Ausschleußung intakter Viren in diesen Zellen möglich ist.
Dies bedeutet aber, daß ein Austausch von Hämagglutinin menschlicher Influenza-A-Wildstämme durch ein anderes

Hämagglutinin, welches von menschlichen Fibroblasten gespalten werden kann - zum Beispiel in Rekombinationsexperimenten zur Entwicklung neuer Lebendvaccinen - zu Rekombinanten führen könnte, welche von menschlichen Fibroblasten in infektiöser Form produziert werden könnten.

Wie schon erwähnt, konnte in Tierversuchen gezeigt werden (Vallbracht et al. 1980), daß durch solche Rekombinationsexperimente Rekombinanten isoliert wurden, die sehr schnell über den Respirationstrakt zu einer Generalisierung und einer Ausbreitung in das Gehirn führten. Molekularbiologische Untersuchungen dieses Systems zeigten, daß der Austausch des HA gegen ein in Mäusefibroblasten spaltbares HA diese Änderung der Pathogenität hervorruft.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit muß damit gerechnet werden, daß die Gefahr besteht, daß durch Rekombinationsexperimente mit an Menschen adaptierten Wildstämmen von Influenza-A Rekombinanten isoliert werden können, welche eine viel stärkere Virulenz für die Menschen besitzen als die Ausgangsstämme.

Kürzlich wurde aus Moskau über Versuche mit einer Influenza-A-Lebendvaccine berichtet, die durch Rekombination mit dem Virus der Klassischen Geflügelpest entstanden ist (Ghendon et al. 1978).
Das Virus der Klassischen Geflügelpest ist avirulent für den Menschen, besitzt aber ein Hämagglutinin, welches leicht gespalten werden kann.
Hält man sich die durch die Rekombinationsexperimente von FPV/Rostock und England 1/61 (Vallbracht et al. 1980) erzielten Ergebnisse und die Möglichkeit der Übertragbarkeit dieser Hypothese auf den Menschen, wie es in der vorliegenden Arbeit aufgezeigt wurde vor Augen, so ist die Einbeziehung

von FPV, eines Virus mit erheblichen neurotropen Potentials durch seinen leicht spaltbaren Hämagglutinin-Typ, in Rekombinationsexperimente mit gut an den Menschen adaptierten Stämmen ein nicht kalkulierbares Risiko.

Zusammenfassung

Die beiden zentralen Fragestellungen dieser Arbeit lauten:

1. Gibt es humane Influenza-A-Isolate, die einen produktiven Replikationszyklus in menschlichen Fibroblasten durchmachen? Gibt es eine Korrelation zur Virulenz dieser Stämme in vivo?
2. Falls Punkt 1 nicht zutrifft, liegt die Ursache einer abortiven Infektion (das heißt einer Infektion ohne Produktion infektiöser Partikel) in der fehlenden Spaltbarkeit der HA-Typen in diesen Zellen?

21 menschliche Influenza-A-Isolate der letzten 10 Jahre wurden auf Vermehrung in humanen Fibroblasten untersucht.

Bei ihnen konnte kein produktiver Replikationszyklus in menschlichen Fibroblasten festgestellt werden.

Eine auf die Lunge beschränkte Influenza-Infektion könnte auf der Unfähigkeit menschlicher Fibroblasten beruhen, infektiöse Influenza-A-Viren humaner Herkunft zu produzieren.

Es scheint keine Korrelation zwischen der Vermehrung in menschlichen Fibroblasten in vitro und der Virulenz der untersuchten Stämme in vivo zu geben.

Die Spaltung des Oberflächenantigens Hämagglutinin durch Trypsinbehandlung der Viren in vitro führt zu einer signifikanten Vermehrung der infektiösen Partikel von Influenza-A; das heißt: die Ursache einer abortiven Infektion liegt in der fehlenden Fähigkeit menschlicher Fibroblasten das Hämagglutinin humaner Influenza-A-Viren zu spalten.

In diesen Zellen kann die Information der Gene von Influenza-A-Viren verwirklicht werden, intakte Viruspartikel können zusammengebaut und ausgeschleußt werden.

Es besteht die Möglichkeit, daß alleiniger Hämagglutininaustausch zu einer erheblichen Verstärkung der Virulenz von Influenza-A-Viren führen kann.

Literaturverzeichnis

1) Burnet,F.P. and Lind,P.E.: Reaction of heat inactivated influenza virus by recombination. Austr J exp Biol med Sci 32 133-143 (1954)

2) Bosch,F.X., Orlich,M., Klenk,H.-D. and Rott,R.: The structure of the hemagglutinin, a determent for the pathogenicity of influenza viruses. Virology 95 197-207 (1979)

3) Clarke,D.H. and Casals,J.: Techniques for hemagglutination and hemagglutination inhibition with athropode borne viruses. Amer J trop Med Hyg 7 561-565 (1958)

4) Comittee on Standard Serological Procedures in Influenza Studies: An agglutination inhibition test proposed as a standard reference in influenza diagnostic studies. J immunol 65 347-353 (1950)

5) Fox,J.P. and Kilbourne,E.D.: Epidemiology of influenza - Summary of influenza workshop IV. J infect Dis 128 361-386 (1973)

6) Francis,I.jr. and Maassab,H.F.: Influenza viruses; in Horsfall and Tamm, Viral and rickettsial infections of man, 4th edition, 689-740 (Lippincott, Philadelphia 1965)

7) Ghendon,Y., Klimov,A., Blagoveshenskaya,O. and Genkina,D.: Investigation of recombinants of human influenza and fowl plaque viruses. I gen Virol 43 183-191 (1979)

8) Hirst,G.K.: Genetic recombinations with Newcastle disease virus, poliovirus and influenza. Cold Spr Harb Symp Quant Biol 27 303-309 (1962)

9) Klenk,H.D. and Rott,R.: Formation of influenza virus protein. J Virol 11 823-831 (1973)

10) Klenk,H.D.: Viral envelopes and their relationship to cellular membranes. Curr Top Microbiol Immunol (Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York) 68 29-58 (1974)

11) Klenk,H.D., Rott,R., Orlich,M. and Blödorn,J.: Activation of Influenza-A-Virus by trypsin treatment. Virology 68 426-439 (1975)

12) Laver,W.G., Downie,J.C. and Webster,R.G.: Studies on the antigenetic variation in influenza virus. Evidence for multiple antigenetic determinants on the hemagglutinin subunits of A/Hong Kong/68 (H3N2) virus and the A/England/72 strains. Virology 59 230-244 (1974)

13) Lang,G., Gagnon,A. and Gerachi,J.R.: Isolation of an Influenza-A-Virus from Seals.
Arch Virol 68 189-195 (1981)

14) Lazarowitz,S.G., Compans,R.W. and Choppin,P.W.: Influenza virus structural and nonstructural proteins in infected cells and their plasma membrane.
Virology 46 830-843 (1971)

15) Lazarowitz,S.G., Compans,R.W. and Choppin,P.W.: Proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide of influenza virus. Function of the uncleaved polypeptide HA.
Virology 52 199-212 (1973)

16) Pons,M.W. and Hirst,G.K.: Polyacrylamide gel electrophoresis of influenza virus RNA.
Virology 34 385-388 (1968)

17) Pons,M.W.: Further studies on influenza virus RNA; in Abstracts from the 3rd international Congress for Virology in Madrid. p 176 (1975)

18) Schäfer,W.: Vergleichende sero-immunologische Untersuchungen über die Viren der Influenza und klassischen Geflügelpest.
Z Naturf 10b 81-91 (1955)

19) Scholtissek,C., Vallbracht,A., Flehmig,B. and Rott,R.: Correlation of pathogenicity and gene constellation of Influenza-A-Virus.
II. Highly neurovirulent recombinants derived from non-neurovirulent or weakly neurovirulent parent virus strains.
Virology 95 492-500 (1979)

20) Simpson,R.W.: Genetic studies with Influenza-A-Virus; in Ciba Found Symp Cellular Biology of Myxovirus Infection.
187-206 (1964)

21) Stanley,P., Gandhi,S.S. and White,D.O.: The polypeptides of influenza virus. VII. Synthesis of the hemagglutinin.
Virology 53 92-106 (1973)

22) Simpson,R.W.: Influenza virus: Genetics and control.
Science 163 409-412 (1969)

23) Stuart-Harris,C.H.: A neurotropic strain of human influenza virus.
Lancet i 427-439 (1939)

24) Sugiura,A. and Kilbourne,E.D.: Genetic studies of influenza viruses. III. Production of plaque-type recombination with A_0 and A_1 strains.
Virology 29 84-91 (1966)

25) Skehel,J.J.: Polypeptide synthesis in influenza virus-infected cells.
Virology 49 23-36 (1972)

26) Vallbracht,A.,Scholtissek,C.,Flehmig,B. and Gerth,H.-J.: Recombination of Influenza-A-strains with fowl plague virus can change pneumotropism for mice to a generalized infection with involvement of the central nervous system.
Virology 107 (1980)

27) Webster,R.G.,Hinshaw,V.S.,Bean,W.J.,Van Wyke,K.L., Gerachi,J.R.,Aubin,D.J. and Peterson,G.: Characterisation of an Influenza-A-Virus from seals.
Virology 13 712-724 (1981)

Lebenslauf

Am 27.12.1951 wurde ich, Dipl. Biol. Michael Keuser, als Sohn des Finanzbeamten Heinrich Keuser und seiner Ehefrau Lieselotte Keuser, geb. Specht in Boppard geboren. Im Frühjahr 1957 wurde ich in die Volksschule Boppard eingeschult und wechselte im Frühjahr 1962 auf das Kant-Gymnasium Boppard, wo ich 1972 das Abitur ablegte.
Im Wintersemester 1972 begann ich an der Universität Frankfurt das Studium der Biologie und bestand dort im Frühjahr 1974 das Vordiplom. Anschließend wechselte ich an die Universität Tübingen, an der ich 1978 die Diplomprüfung mit dem Hauptfach Mikrobiologie ablegte. Meine Diplomarbeit führte ich im Fachbereich Biologie, Abteilung Mikrobiologie, unter der Anleitung von Herrn Prof. Braun durch.
1978 begann ich das Studium der Medizin an der Universität Bochum, an der ich 1979 das Physikum ablegte. Seit 1979 studiere ich Medizin an der Universität Tübingen. Im April 1980 legte ich den ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung ab. Im Herbst 1980 begann ich unter der Anleitung von Herrn Prof. Gerth meine Dissertation. Im Oktober 1982 bestand ich den zweiten Abschnitt der ärztlichen Prüfung.
Das Praktische Jahr absolvierte ich im Kreiskrankenhaus Böblingen. Den dritten Abschnitt der ärztlichen Prüfung bestand ich am 28.10.1983.